

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1958

THÈSE

84

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Denise BUFFE

Née le 19 mai 1924, à Montreuil-sous-Bois (Seine)

Présentée et soutenue publiquement le

195

**Action de l'Actinomycine C
en culture de tissus**

Président : M. VERNE, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1958

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Denise BUFFE

- Née le 19 mai 1924, à Montreuil-sous-Bois (Seine)

Présentée et soutenue publiquement le

195

**Action de l'Actinomycine C
en culture de tissus**

Président : M. VERNE, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DOYEN HONORAIRE :

M. Baudouin

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Baudouin, Bénard (H.), Brocq, Cadenat, Carnot, Chabrol, Champy, Chevassu, Debré (R.), Delbet, Donzelot, Gastinel, Guillaïn, Halphen, Harvier, Laroche (G.), Laubry, Lemaître, Lévy-Solal, Lhermitte, Lian, Loeper, Marion, Mathieu, Mocquot, Mondor, Mulon, Olivier (E.), Richet (Ch.), Sannié, Sézary, Tanon, Velter.

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESEUR Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	CORDIER (G.)
Anatomie pathologique	DELARUE (A.)
Bactériologie	FASQUELLE
Biologie appliquée à l'Éducation physique et aux sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Carcinologie	OBERLING (C.)
Chimie médicale	JAYLE (M.-F.)
	Hôtel-Dieu MÉNÉGAUX (G.)
Cliniques chirurgicales	Broussais DE GAUDART-D'ALLAINES (F.)
	Salpêtrière MOULONGUET
	Cochin QUÉNU (J.)
Clinique chirurgicale réparatrice et orthopédique	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de cardiologie	MOUQUIN (M.)
Clinique de chirurgie infantile et d'orthopédie	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire	MONOD (R.)
Clinique de la tuberculose	BERNARD (Et.)
Clinique de neuro-chirurgie	PETIT-DUTAILLIS (D.)
Clinique de puériculture	LELONG (M.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	DEGOS (R.)
Clinique des maladies du sang	CHEVALLIER (P.)
Clinique des maladies du système nerveux	ALAJOUANINE (T.)
Clinique des maladies des enfants	CATHALA
Clinique des maladies infectieuses	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY (J.)
Clinique gynécologique	FUNCK-BRENTANO (P.)
	Hôtel-Dieu BARIETY
Cliniques médicales	Bichat JUSTIN-BESANÇON
	Cochin MOREAU (R.)
	Broussais DE GENNES (L.)
Clinique médicale d'hydro-climatologie thérapeutique	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition	BOULIN (R.)
	Tarnier LANTUÉJOL (P.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque VARANGOT
	Port-Royal LACOMME (M.)
Clinique ophtalmologique	RENARD
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBIN (A.)
Clinique physio-pathol. des problèmes alimentaires	HAMBURGER
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER (C.)
Clinique rhumatologique et sociale	COSTE (F.)
Clinique stomatologique	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale	SÈNÈQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique	FEY (B.)

Embryologie	GIROUD (A.)
Génétique médicale	LAMY (M.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	SOULIÉ
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance	TURPIN
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (C.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIÉDELIEVRE (R.)
Parasitologie et histoire naturelle médicale	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	SICARD
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	LENÈGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (chaire à titre personnel)	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	BARIÉTY (M.)
Pathologie et thérapeutiques générales	GARCIN (J.)
Pédiatrie sociale	MARIE (J.)
Pharmacologie et matière médicale	HAZARD (R.)
Physico-chimie médicale (chaire à titre personnel)	DOGNON (A.)
Physiologie	BINET (L.)
Physique médicale	STROHL (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale	PATEL (J.)
Thérapeutique	BROUET

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

MM.	MM.
Anatomie { DELMAS (A.) <i>pr. s. ch.</i> DEBEYRE (J.) OLIVIER CABROL	Obstétrique { MORIN (P.) RAVINA (J.) LELORIER ROBEY
Anatomie pathologique { GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) <i>pr. s. ch.</i> BUSSE (F.) GUYGOU (Ch.)	Ophthalmologie { DESIGNES (P.) BRÉGEAT
Bactériologie { NÉVOT (A.) CHRISTOL	Orthopédie JIDET (R.)
Biochimie médicale { ETTORI (J.) <i>pr. s. ch.</i> POLONOVSKI (J.) SCHAPIRA DESGREZ (P.)	Oto-rhino-laryngologie { AUBRY (M.) MADURO (M.)
Biologie médicale BOURLIÈRE (F.)	Parasitologie { CHABAUD (A.) BRUMPT (L.)
Dermato-syphiligraphie DUPERRAT (F.)	Pathologie chirurgicale { ABOULKER (P.) BAUMANN (J.) GOSSET (J.) LAURENCE (G.) LORTAT-JACOB (J.) OLIVIER (Cl.) POILLEUX (F.) VERNE (J.-M.) BARCAT CAUCHOIX DUBOST FAUREL FLABEAU GERMAIN MATHEY THOMERET
Embryologie TUCHMANN	Pathologie expérimentale { MAURICE LOEPER (J.)
Histologie { BULLIARD (H.) <i>pr. s. ch.</i> COUJARD	Pathologie médicale { BERNARD (J.) BOUDIN (G.) CASTAIGNE (P.) CONTE (M.) DOMART (A.)
Hydrologie CORNET	
Hygiène { BOYER (J.) <i>pr. s. ch.</i> DEPARIS (M.) <i>pr. s. ch.</i>	
Maladies infectieuses BASTIN	
Médecine légale et du travail { DEROBERT (L.) <i>pr. s. ch.</i> GAULTIER (M.) HADENGUE (A.) ALBAHARY	
Neurochirurgie DAVID (M.)	
Neurologie LHERMITTE	
Obstétrique { GRASSET (J.) LEPAGE (F.) MERGER (R.)	

	MM.		MM.
Pathologie médicale	LAMOTTE (M.)	Physiologie	{ BARJETON (D.) <i>pr. s. ch.</i>
	LAROCHE (Cl.)		{ PARROT (J.) <i>pr. s. ch.</i>
	MILLIEZ (P.)		{ DEJOURS (P.)
	PÉQUIGNOT (H.)	Physique	
	PERRAULT (M.)	médicale	{ DJOURNO (A.) <i>pr. s. ch.</i>
	RAMBERT (P.)		{ GOUGEROT (L.) <i>pr. s. ch.</i>
	THIEFFRY (St.)	Pneumo- phtisiologie . . .	KREIS (B.)
	TURIAF (J.)	Psychiatrie . . .	{ BARUK
	BOUVIER		{ PICHOT
	BRICAIRE	Psychiatrie	
	BRISAUD	infantile	MICHAUX (Z.)
	DEROT	Rhumatologie . .	DELBARRE
	MALREZ	Stomatologie . .	{ CHAPUT (Mme A.)
	ROYER		{ CERNÉA (P.)
Pédiatrie	WOLFROMM	Thérapeutique . .	{ CHASSAGNE
	{ JOSEPH (R.)		{ PERRAULT
	{ POLONOVSKI (Cl.)	Urologie	KLISS (R.)
Pharmacologie . .	{ MOZZICONACCI		
	{ CHEYMOL (J.) <i>pr. s. ch.</i>		
	{ LÉVY (Mlle J.) <i>pr. s. ch.</i>		

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

	MM.		MM.
Clinique chirurgicale . . .	AMELINE (A.)	Clinique	
	HUGUIER (J.)	médicale	{ KOURILSKY (R.)
	LÉGER (L.)		{ MARCHAL (G.)
	PADOVANI (P.)	Clinique	
	ROUX (M.)	obstétricale . . .	{ ESCALLE (G.)
Clinique médicale	RUDLER (J.C.)		{ MAYER (M.)
		Clinique	
	{ DREYFUS (Gilbert)	ophtalmologique	OFFRET (G.)
	{ HAGUENAU (M.) <i>pr.s.ch.</i>	Clinique	
		urologique	COUVELAIRE (R.)

Secrétaire général de la Faculté M. MOREL (J.)
 Secrétaire Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur, chargé de la direction M. le Docteur HAHN (A.)
 Conservateur Mlle GOICHON
 Bibliothécaires { Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.),
 LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

*Avec toute mon affection et toute ma
reconnaissance.*

A MES AMIS

AU DOCTEUR HENRI GUÉRIN

Conseiller Général de la Seine
Officier de la Légion d'Honneur

*Qui a fait naître en nous la vocation
de la Médecine.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN VERNE

Professeur de la Chaire d'Histologie
à la Faculté de Médecine de Paris

Assesseur de Monsieur le Doyen de la Faculté de Médecine de Paris

Membre de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'Honneur

*Qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.*

*En témoignage de notre profonde admi-
ration.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. KOURILSKY

Médecin de l'Hôpital Saint-Antoine
Officier de la Légion d'Honneur
Directeur du Centre d'Immuno-Pathologie
de l'Association Claude-Bernard

A MADAME LE DOCTEUR S. KOURILSKY

Médecin-Assistant à l'Hôpital Saint-Antoine

*Qui nous ont accueillie dans leur service.
Que cette thèse soit le gage de notre
affectueuse reconnaissance.*

AU DOCTEUR ROGER ROBINEAUX

*Qui nous a donné le sujet de cette thèse
et nous a guidée pour sa réalisation.*

AU DOCTEUR GUY VOISIN

*Qui a guidé nos premiers pas dans la
recherche.*

Amicale reconnaissance.

INTRODUCTION

Les cultures de tissus sont couramment employées pour déterminer *in vitro* l'activité des substances toxiques. Différents auteurs [1 - 2 - 3 - 4 - 5] se sont demandés si les réponses que donnaient ces deux méthodes pouvaient être superposables. En particulier, J. VERNE a étudié la toxicité d'un certain nombre de drogues minérales et organiques en culture de tissus, comparativement à la toxicité que présentent ces substances vis-à-vis de l'organisme entier. De ces travaux, il résulte que la sensibilité est variable suivant le produit et la souche utilisés. Ainsi les sels de cuivre sont plus toxiques pour les cellules *in vitro* que pour l'organisme entier. Par contre, l'atropine [6] est d'une toxicité nettement moindre en culture de tissus humains que chez l'homme.

EAGLE et FOLEY [5] ont testé par cette méthode 15 composés chimiques. Les 13 corps qui présentaient *in vivo* une activité antitumorale, furent hautement cytotoxique *in vitro*, tandis que les 2 substances inactives chez l'animal, le furent également en culture de tissus.

Ces exemples et les travaux de EICHORN et POMERAT suffisent à montrer, selon les propres conclusions de ces auteurs, qu'il ne peut être extrapolé systématiquement d'une méthode à l'autre. Il n'en reste pas moins que les résultats obtenus peuvent être utilement comparés.

L'étude d'une substance toxique, antimitotique par exemple, ne peut se limiter à définir une concentration inhibitrice de la croissance, elle doit essayer de préciser les structures cellulaires atteintes et les troubles du métabolisme qui en résultent.

Si les modalités morphologiques de la division cellulaire sont connues depuis longtemps, les réactions enzymatiques qui interviennent, les synthèses qui s'y produisent sont encore mal précisées. On peut supposer que les perturbations limitées et caractéristiques de la mitose, obtenues avec certains produits, sont le reflet d'un trouble chimique et que la connaissance de ce trouble par la recherche d'inhibiteurs par exemple, précisera du même coup un des aspects du mécanisme de la mitose normale.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier les lésions cellulaires provoquées par l'actinomycine C en culture de tissus, comparativement à son action antimitotique *in vivo*.

HISTORIQUE

[7 à 26]

De nombreux chercheurs ont essayé d'étendre le spectre d'activité des antibiotiques au domaine de la cancérologie. Il semble bien en effet que leur action bactériostatique soit à rapprocher des poisons mitotiques. Les recherches qui ne cessent de se poursuivre dans ce domaine, ont montré que les produits extraits de certaines variétés d'actinomycètes possèdent des propriétés cytostatiques indiscutables.

En 1940, WASKMANN et WOODRUFF [7] ont isolé l'actinomycine A qui exerçait une action très nette sur certains tissus, en particulier sur le système lymphoïde, mais sa grande toxicité en fit abandonner l'étude. En filtrant des cultures de *Streptomyces chrysomallus*, des chercheurs allemands [14 - 15 - 16] obtinrent en 1947 un antibiotique très voisin de l'actinomycine A : ils la dénommèrent actinomycine C. En effet, entre temps, DALGLIESH et TODD [17] avaient préparé un produit similaire : l'actinomycine B. Depuis, d'autres auteurs ont isolé les actinomycines M, X, J, D, E et F [18 à 26].

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

[26 à 40]

Tous ces produits se présentent sous la forme d'une substance faiblement basique, soluble dans le chloroforme, l'acétone, l'éthanol et l'acétate d'éthyl, légèrement soluble dans l'eau. Elles sont composées d'un groupe de polypeptides qui diffèrent seulement par le genre, le nombre et la disposition de leurs acides aminés et d'un groupement chromophore de nature quinonique.

Dans le cas de l'actinomycine C, BROCKMANN et collaborateurs [29] ont montré qu'il s'agissait en réalité d'un mélange d'actinomycine C₁, C₂ et C₃ possédant le même groupement chromophore et différant entre elles par l'absence d'un acide aminé. Une hydrolyse ménagée en présence d'hydroxyde de baryum libère une partie du

groupement chromophore sous forme de despeptido-actinomycine, produit rouge bien cristallisé, dérivé de l'azanthraquinone. La fraction polypeptidique de la molécule est constituée de 6 acides aminés :

l-thréonine ;
l-proline ;
d-valine ;
l-m-méthylvaline ;
sarcosine ;
d-allo-isoleucine.

La formule supposée de l'actinomycine C est :



ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

[41 à 52]

En 1950, la collaboration de plusieurs savants allemands, parmi lesquels A. BOHNE et H. FRIEDRICH, BROCKMAN, et HACKMANN, permirent à ce dernier de constater que l'actinomycine C exerçait une action cytostatique directe sur les tumeurs malignes de l'animal. Elle provoque une inhibition franche des tumeurs greffées, soit que les greffons aient été au préalable mis en contact avec diverses dilutions de l'antibiotique, soit à la suite d'injection parentérale qui entraîne un ralentissement plus ou moins notable de la croissance des tumeurs et prolonge la vie des animaux qui en sont porteurs. HACKMANN a pu établir qu'elle freine dans d'importantes proportions l'évolution du carcinome d'Erhlich, du sarcome S 37 de la souris et celle de la tumeur de Walker du rat. FIELD [49] et ses collaborateurs l'ont étudiée sur le sarcome 180, le carcinome R.C. et la leucémie des souris.

Des expériences concomitantes ont permis d'établir que l'actinomycine C entraînerait en quelques heures une chute considérable de l'index mitotique tant dans les glandes de Lieberkühn des animaux auxquels avaient été injectées par voie veineuse des solutions d'actinomycine que dans les cellules pathologiques des tumeurs.

Etudiant plus particulièrement les cellules des glandes de Lieberkühn des animaux traités, HACKMAN a constaté une augmentation du nombre des mitoses et en particulier des métaphases dans les cinq premières heures qui suivent l'injection ; puis rapidement une chute de l'index mitotique. Enfin, après vingt-deux heures, il a pu noter un retour progressif à la normale. Pour cet auteur, l'augmentation

initiale du nombre des mitoses serait due à un ralentissement du processus mitotique simulant une augmentation du nombre de certains stades.

PLAN DE NOS RECHERCHES

D'après les conclusions de HACKMAN, l'actinomycine C pourrait être rapprochée des poisons radiomimétiques. Nous avons donc étudié dans la première partie de ce travail, l'action toxique de cet antibiotique sur la croissance des fibroblastes d'embryons de poulet et sur les cellules de la souche Hela : d'une part en mesurant au planimètre la zone de croissance des explants, d'autre part en déterminant l'index mitotique. Ces mesures ont été faites sur des préparations fixées au Zenker-formol et colorées par l'hématoxyline de Harris selon les techniques décrites plus loin.

Notre étude a porté également sur les lésions provoquées par cette substance au niveau des chromosomes, des mitochondries et des nucléoles. Pour ce, l'observation directe au microscope à contraste de phase a été utilement complétée par la réaction nucléale de Feulgen et les colorations à l'hématoxyline ferrique et au vert de méthylpyronine.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons essayé d'interpréter l'action toxique de l'actinomycine par la recherche de substances inhibitrices.

TECHNIQUES

I. — CULTURE

A) *TISSUS NORMAUX*

Nous avons utilisé des fragments de muscles squelettiques et de conjonctif d'embryon de poulet de dix à onze jours, cultivés en goutte pendante selon la technique de CARREL, dans un milieu comprenant du plasma de coq au 1/2 et de l'extrait embryonnaire.

Après quarante-huit heures de croissance, l'explant est monté sur anneau de Gey, dans une solution d'actinomycine, et observé au microscope à contraste de phase, la température étant maintenue à 37°.

La solution d'actinomycine (Sanamycine Bayer) est faite à des concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g d'actinomycine par centimètre cube de solution physiologique de Hanks.

Des cultures témoins sont montées de la même façon dans la solution physiologique de Hanks et laissées pendant le même laps de temps à l'étuve à 37°.

Après un temps de contact variant de deux à six heures, les cultures sont fixées et colorées selon les techniques décrites plus loin.

Dans un deuxième groupe d'expériences, nous introduisons directement l'actinomycine dans le milieu de culture : les fragments sont mis en présence d'un milieu formé d'une goutte de Hanks, une goutte de plasma, une goutte d'extrait embryonnaire, une goutte de la solution d'actinomycine qui se trouve ainsi aux concentrations terminales de 10^{-8} , $1/2 \cdot 10^{-7}$, $1/4 \cdot 10^{-7}$ et $1/4 \cdot 10^{-6}$ (les concentrations supérieures se sont révélées trop toxiques, entraînant une inhibition totale de la croissance). Au bout de quarante-huit heures, les cultures sont fixées et colorées.

B) *SOUCHE HELA*

(Culture en couche monocellulaire de cellules
provenant d'un carcinome humain)

Après trypsinisation, la suspension cellulaire est répartie dans des tubes analogues à ceux décrits par REISSIG et MELNICK [53] : les cellules vont se déposer sur une lamelle rectangulaire qui adhère à la paroi du tube par simple phénomène de tension superficielle. Le milieu de culture utilisé est ici un milieu semi-synthétique à base d'hydrolysate de caséine, de solution de vitamines et de sérum de cheval. Il suffit d'introduire la drogue à la concentration voulue dans ce milieu, et après un temps de contact variable, la lamelle est extraite du tube, la culture est fixée et colorée par les mêmes procédés que pour les cultures d'embryons de poulet.

II. — FIXATIONS ET COLORATIONS DES PRÉPARATIONS

A) *FIXATIONS*

Avant toute fixation, les cultures sont lavées dans le Hanks à 37°.

1) MELANGE DE HELLY [54]

Ce fixateur est formé d'une solution de formol à 40 % et de liquide de Zenker.

Composition du liquide de Zenker :

— Bichlorure de mercure	5 g
— Bichromate de potassium	2,5 g
— Sulfate de sodium	1 g
— Eau distillée	100 cm ³

Les explants sont fixés vingt-minutes par le mélange suivant, préparé au moment de l'emploi :

— Zenker	9 parties
— Formol	1 partie

Après fixation, lavage à l'eau courante pendant une heure pour éliminer la bichromate de potassium ; et passage rapide dans l'alcool iodé puis dans l'hyposulfite de soude, pour éliminer le mercure.

2) FIXATION AU « BENSLEY »

(Technique modifiée par CHEVREMENT)

Liquide de Bensley :

— Acide osmique à 2 %	2 parties
— Bichromate de potassium à 3 %	8 parties

La culture est soumise aux vapeurs d'iode pendant 30 secondes, puis recouverte pendant 2 minutes 30 secondes par le liquide de Bensley.

Après rinçage rapide à l'eau distillée et lavage à l'eau courante, 10 minutes, la culture est mise au contact d'une solution de permanganate de potassium à 1 % pendant 1 minute 30 secondes, puis passée successivement dans plusieurs bains d'acide oxalique à 3 % jusqu'à décoloration complète.

Lavage à l'eau courante.

3) CARNOY [55]

— Chloroforme	3 volumes
— Alcool absolu	6 volumes
— Acide acétique cristallisé	1 volume

Fixation pendant trente minutes.

B) COLORATIONS

1) HEMATOXYLINE DE HARRIS

PRÉPARATION :

— Hématoxyline	1 g
— Alcool éthylique à 95°	10 cm ³
— Alun de potassium ou d'ammonium	20 g
— Eau distillée	200 cm ³
— Oxyde jaune de mercure	0,5 g

Les cristaux d'hématoxyline sont dissous dans l'alcool ; la solution obtenue est mélangée à chaud à la solution d'alun et d'eau distillée, et le mélange est porté à l'ébullition. A ce moment, on ajoute

très doucement l'oxyde de mercure et l'on maintient l'ébullition jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge pourpre. Après refroidissement, la solution est prête à l'emploi. On peut y ajouter 2 cm³ d'acide acétique glacial pour 100 cm³ ; la conservation est moins bonne, mais les noyaux fixent mieux le colorant.

TECHNIQUE DE COLORATION :

Après fixation au Zenker-formol, les lamelles sont déposées à la surface de l'hématoxyline, l'explant baignant dans la solution. Toutes les cinq minutes, on suit la coloration au microscope. En général, pour les cultures en gouttes pendantes, quinze à vingt minutes de contact sont nécessaires et cinq à dix minutes suffisent pour les cultures en couche monocellulaire.

Lorsque la coloration est au point, lavage à l'eau courante pendant au moins deux heures : la préparation bleuit.

Déshydratation et montage au baume de Canada suivant les techniques usuelles.

2) HEMATOXYLINE FERRIQUE DE HEIDENHAIN

PRÉPARATION DU COLORANT :

- Hématoxyline	1 g
- Alcool absolu	10 cm ³
— Eau distillée	10 cm ³
-- Camphre	1 cristal

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool absolu. Laisser à la lumière du jour vingt-quatre à quarante-huit heures. Ajouter l'eau distillée, le cristal de camphre et quelques gouttes d'une vieille solution d'hématoxyline. Laisser vieillir quinze jours avant l'emploi. La solution est d'autant meilleure qu'elle est plus ancienne.

TECHNIQUE DE COLORATION :

Après fixation au Bensley, la coloration doit être précédée d'un mordantage dans une solution d'alun de fer et d'ammonium à 3 % pendant quatre à douze heures.

Après rapide lavage à l'eau distillée, coloration dans la solution d'hématoxyline pendant huit à vingt-quatre heures : la préparation devient noire.

Rapide lavage à l'eau distillée et différenciation dans l'alun de fer à 3 %.

Il est indispensable de retirer les préparations toutes les minutes pour contrôler la différenciation. On les lave ensuite rapidement à l'eau distillée et on les examine au microscope. Les temps de différenciation varient beaucoup suivant l'épaisseur de l'explant et l'élément nucléaire ou cytoplasmique que l'on veut distinguer.

Laver soigneusement, déshydrater et monter au baume.

3) VERT DE METHYL - PYRONINE [56]

Lorsque les préparations sont traitées par le mélange vert de méthyl-pyronine, suivant UNNA-PAPPENHEIM, les ribonucléines se colorent par la pyronine tandis que les desoxyribonucléines fixent le vert de méthyl. Mais cette coloration est d'une spécificité relative, elle varie suivant l'objet, le fixateur et le pH de la solution. En effet, tout constituant cellulaire passe d'une affinité exclusive pour la pyronine à une affinité progressivement croissante pour le vert de méthyl lorsqu'on fait varier le pH de la solution.

Pour les cultures fixées au Zenker-formol, les meilleures colorations sont obtenues avec des solutions de colorant à pH 3.

Après fixation au Carnoy, le pH optimum est 4.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE COLORANTS :

Les colorants employés sont des colorants Geigy — le vert de méthyl renferme une certaine quantité de violet de méthyl qui doit être éliminé auparavant en l'entraînant par le chloroforme dans lequel il est soluble.

Composition de la solution de colorant :

— Vert de méthyl (épuisé par le chloroforme).	150 mg
— Pyronine	250 mg
— Solution tampon	100 cm ³

Solution tampon de Mc Ilvain :

pH 3	}	— Acide citrique M/10	15,89 cm ³
		— Phosphate dissodique M/5	4,11 cm ³
pH 4	}	— Acide citrique M/10	12,29 cm ³
		— Phosphate dissodique M/5	7,71 cm ³

TECHNIQUE DE COLORATION :

La solution de colorant est mise au contact de l'explant pendant quinze à vingt minutes. Rincer rapidement à l'eau distillée puis déshydrater par un passage très rapide également, dans les alcools et monter la préparation.

4) REACTION NUCLEALE DE FEULGEN-ROSSENBECH [57]

Cette réaction met en évidence de façon spécifique l'acide désoxyribonucléique : après une hydrolyse modérée, le D.N.A. traité par le réactif de Schiff (fuchsine décolorée par l'acide sulfureux) donne naissance à une matière colorante rouge violette.

MÉCANISME DE LA RÉACTION :

Une hydrolyse acide modérée rompt la liaison glucosidique qui unit les bases puriques au désoxyribose de la molécule d'acide désoxyribonucléique. Après cette rupture, une proportion importante de pentose passe sous une forme aldéhydique qui réagit avec le réactif de Schiff pour donner un complexe coloré insoluble.

Préparation des réactifs.

1) Acide chlorhydrique normal :

— Acide chlorhydrique (d = 1,19)	82,5 cm ³
— Eau q.s.p.	1.000 cm ³

2) Réactif de Schiff :

— Fuchsine basique	1,5 g
— Métabisulfite de potassium	1,5 g
— Acide chlorhydrique concentré	3 cm ³
— Eau	200 cm ³

Broyer finement dans un mortier la fuchsine et dissoudre dans les 200 cm³ d'eau. Ajouter le métabisulfite de potassium réduit en poudre et, après dissolution, ajouter 3 cm³ d'acide chlorhydrique concentré ou 30 cm³ de ClH normal ; boucher hermétiquement ; la solution se décolore progressivement. Attendre douze heures avant l'emploi. Le réactif de Schiff doit être jaune paille ou incolore, une coloration rouge ou rose indique que la fuchsine initiale a été régénérée ; dans ce cas, le réactif doit être rejeté.

Pour avoir un réactif parfaitement incolore, on peut mettre la solution après décoloration pendant une à quelques minutes en contact avec du charbon activé (0,25 g de charbon pour 100 cm³ de solution) et filtrer sur gros filtre.

Le réactif de Schiff doit être conservé à l'abri de la lumière, en flacon hermétiquement bouché, à la glacière. Au bout d'un certain temps, il ne donne plus de résultats satisfaisants pour la réaction de Feulgen, bien qu'il soit encore capable de donner une coloration intense avec les aldéhydes. En règle, il vaut mieux ne pas le conserver plus d'un mois.

3) Bains sulfureux :

— Solution à 10 % de bisulfite de soude anhydre	10 cm ³
— Eau distillée	200 cm ³
— Acide chlorhydrique normal	10 cm ³

TECHNIQUE DE LA RÉACTION :

(Sur des cultures fixées au Zenker-formol.)

Les préparations sont traitées par de l'acide chlorhydrique normal à température constante de 56° pendant quinze minutes, au bout desquelles l'hydrolyse est arrêtée brusquement par rinçage à l'eau distillée. On fait agir ensuite le réactif de Schiff pendant 1 heure 30 minutes. Rincer dans 3 bains sulfureux fraîchement préparés en laissant la préparation dix minutes dans chaque bain, puis rincer à l'eau distillée et monter selon les techniques usuelles.

III. — ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Nous étudions comparativement l'action de l'actinomycine C sur la croissance, d'une part en mesurant la surface de la zone de croissance par rapport à celle de l'explant, d'autre part en déterminant dans chaque préparation le nombre des mitoses et le pourcentage des différentes phases de la division cellulaire. Les mesures de surface sont faites au planimètre après relevé au microscope projectif, des contours des explants et de leur zone de croissance, et nous calculons le rapport :

$$\frac{S_t - S_e}{S_e}$$

pour lequel

S_t représente la surface totale : explants + zone de croissance ;
et S_e : la surface initiale de l'explant.

RÉSULTATS

I. — ACTION SUR LA CROISSANCE

L'actinomycine C exerce une action inhibitrice de la croissance pour des concentrations comprises entre 10^{-6} pour laquelle l'inhibition est totale, et 10^{-7} inhibition partielle.

Les résultats concernant des cultures de quarante-huit heures sont résumés dans le *tableau 1* et le *graphique 1* ci-après.

Si nous évaluons la croissance après vingt-quatre heures de culture en présence de faibles concentrations d'actinomycine, nous constatons une égalité de croissance avec les cultures témoins, quelquefois même nous avons pu noter une légère action excitatrice.

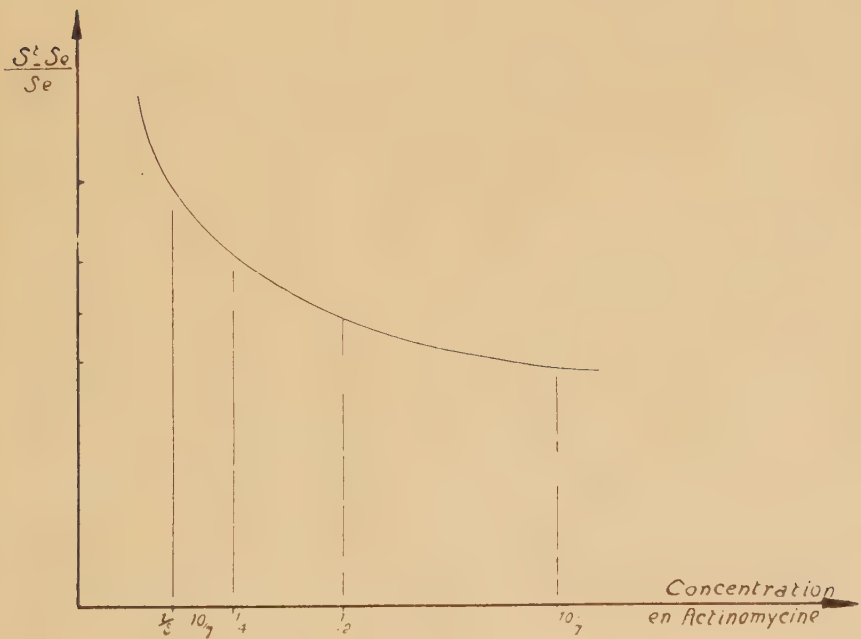
Néanmoins, au bout de quarante-huit heures, la croissance des témoins est toujours supérieure à celle des cultures faites en présence de l'antibiotique.

L'action de l'actinomycine sur la croissance est réversible. En effet, si nous réexplantions en milieu normal des fragments de conjonctif préalablement cultivés en présence d'une solution d'actinomycine 10^{-7} , le cours des mitoses reprend normalement ; les lésions nucléolaires disparaissent et la surface de croissance est identique à celle des témoins. Par contre, si les réexplantations ont lieu en présence d'actinomycine à la même concentration, les effets toxiques se cumulent et la croissance est nulle.

Enfin, il semble qu'il puisse se produire une accoutumance à la drogue : si nous prenons des cultures de quarante-huit heures en présence d'actinomycine à une concentration (10^{-8}) qui n'exerce pas d'action inhibitrice sur la croissance mais pour laquelle on peut néanmoins noter un léger effet cytotoxique, et si nous les réexplantions en milieu 10 fois plus concentré en actinomycine, nous n'observons pas de différence notable entre la surface de croissance de ces cultures et celle des cultures témoins.

TABLEAU I

Concentration en actinomycine	Moyenne des surfaces		St — Se
	Surface totale	Surface de l'explant	Se
0	91,7	23,2	2,9
$1/8 \cdot 10^{-7}$	99,9	27,6	2,6
$1/4 \cdot 10^{-7}$	75,3	24	2,1
$1/2 \cdot 10^{-7}$	48,4	17,2	1,8
10^{-7}	46,8	18,1	1,5



GRAPHIQUE 1

Cette possibilité pour les cellules cultivées *in vitro* d'acquérir une résistance progressive aux substances toxiques, a déjà été signalée par WILSON [58], en 1922, pour le sulfate de cuivre. J. VERNE [3 - 58 - 59] l'a constaté également avec le chlorure de cuivre, le dinitrophénol et l'atropine.

II. — ACTION ANTIMITOTIQUE

1) ETUDE SUR CONJONCTIF D'EMBRYON DE POULET

L'observation en contraste de phase à 37° des cellules mises en présence d'une solution d'actinomycine à la concentration de 1 γ par cm^3 , montre des modifications de la caryocinèse, variable suivant le stade auquel est « surprise » la cellule et suivant la concentration de la solution.

— Lorsque la cellule est en anaphase ou en télophase au début de l'observation, c'est-à-dire environ quinze à vingt minutes après le montage dans la solution d'actinomycine, la division s'effectue de façon absolument normale.

— Si la cellule est en métaphase ou si les chromosomes commencent tout juste à se séparer, l'évolution se fera soit de façon normale vers la division complète, donnant deux cellules filles bien individualisées, soit, et c'est le cas le plus fréquent, vers la formation d'une cellule binucléée.

Ici intervient la concentration de la drogue ; les divisions complètes s'observent plus fréquemment pour les dilutions de l'ordre de 10^{-7} , alors que pour les solutions plus concentrées $1/2 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , on observe généralement la formation de cellules à deux noyaux avec ralentissement du processus mitotique. Ainsi, dans une cellule où l'on observait un début d'anaphase une heure après le contact avec la solution à $1/2 \cdot 10^{-6}$ d'actinomycine C, quatre heures après, alors que les chromosomes ne s'étaient que peu éloignés de la plaque équatoriale, la cellule émettait une succession rapide de boules amœboïdes variables, particulièrement accentuées dans la zone médiane et, six heures après, la cellule reprenait un aspect normal mais avec deux noyaux.

— Enfin, lorsque les cellules étaient en prophase ou commençaient leur division après le contact avec l'actinomycine, nous avons observé un blocage métaphasique quelle que soit la durée de l'observation.

Cette action antimitotique de l'actinomycine n'est manifeste qu'après un temps de latence compris entre trente et soixante minutes, temps qui dépend en partie de la concentration en antibiotique.

Sur plusieurs centaines de cultures de conjonctif d'embryons de poulet ayant convenablement poussées pendant quarante-huit heures et soumises à l'action de l'actinomycine pendant trois heures et demie, nous avons constaté une augmentation importante du nombre des métaphases (*tableau II*).

TABLEAU II

Concentrations d'actinomycine en g par cm ³ de solution	Nombre de métaphase pour 100 mitoses
0	44
10 ⁻⁷	70
1/2 10 ⁻⁶	77
10 ⁻⁶	84,5

Lorsque nous introduisons l'actinomycine directement dans le milieu de culture à la concentration 1/4 10⁻⁷, nous retrouvons cette même augmentation du nombre de métaphases au détriment des prophases et des télophases, qu'il s'agisse de culture de vingt-quatre ou de quarante-huit heures. Dans ces dernières, nous constatons la présence d'importantes lésions nucléolaires, alors qu'elles ne sont encore qu'exceptionnelles et peu intenses après vingt-quatre heures (*tableaux III et IV ; graphique 2*).

Nous n'ignorons pas que cette évaluation pratiquée sur culture en goutte pendante peut être sujette à caution. En effet, ainsi que l'ont fait remarquer VON MOLLENDORF [61], BUCHER et leurs collaborateurs, la superposition des couches cellulaires peut simuler une augmentation de certains stades : métaphase, anaphase et début de télophase, au détriment des prophases et des fins de télophases beaucoup plus difficiles à distinguer. Néanmoins, étant donné l'importance de la marge qui existe entre les cultures témoins et celles soumises à l'action de l'actinomycine, nous pensons pouvoir conclure à un blocage métaphasique, qui peut être rapproché de celui observé par HACKMAN *in vivo*.

Lorsque l'actinomycine est ajoutée à des cultures de quarante-huit heures, pendant trois à six heures la réaction de Feulgen nous

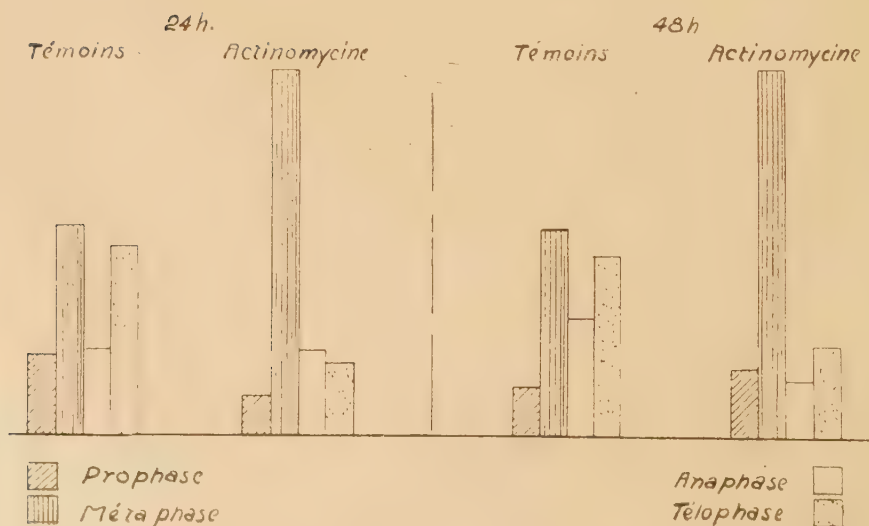
TABLEAU III

<i>Durée de culture</i>	<i>Concentration en actinomycine (γ par cm^3)</i>	<i>Nombre de métaphase pour 100 mitoses</i>
24 heures	0	37
	$1/4 \cdot 10^{-7}$	67
48 heures	0	37,5 %
	$1/4 \cdot 10^{-7}$	66 %

TABLEAU IV
RÉPARTITION DES DIFFÉRENTS STADES

<i>Témoins</i>	<i>Stades</i>	<i>Actinomycine</i>
24 heures :		
14,5 %	Prophase	6 %
37 %	Métaphase	67 %
14,5 %	Anaphase	14 %
34 %	Télophase	13 %
48 heures :		
10 %	Prophase	11 %
37,5 %	Métaphase	66 %
20 %	Anaphase	8 %
32,5 %	Télophase	15 %

GRAPHIQUE 2



a montré une altération des chromosomes pour des concentrations $1/2 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-6} , altérations rappelant celles provoquées par les rayons X : les chromosomes sont courts, épais, agglutinés, la plaque équatoriale prend un aspect granuleux et rétracté (voir *figures* pages suivantes). Dans les quelques anaphases de la préparation, on note la présence de chromosomes retardataires : il est fréquent qu'un chromosome reste au milieu de la plaque équatoriale alors que tous les autres se sont déjà regroupés aux deux pôles de la cellule.

Ces altérations chromosomiales ne s'observent pas pour des concentrations de l'ordre de 10^{-7} bien que le blocage métaphasique soit évident.

DEYSSON et TRUHAUT [62] avaient déjà observé ces lésions des chromosomes sur des cellules végétales ; il semble que le matériel que nous avons utilisé soit 100 fois plus sensible.

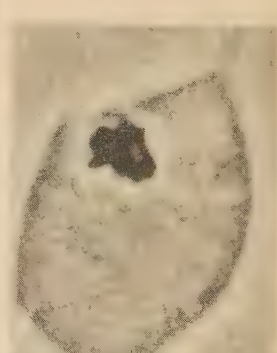
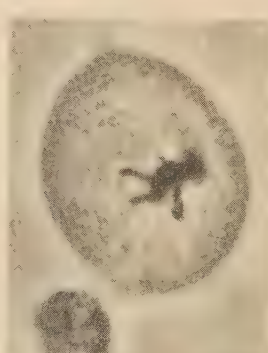
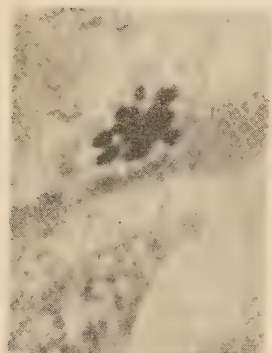
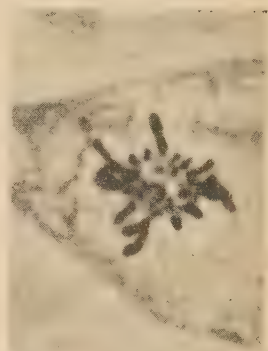
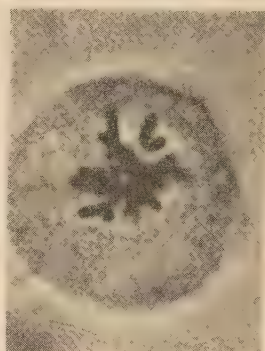
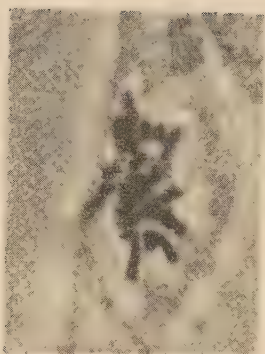
2) ETUDE SUR LA SOUCHE HELA

Ces cultures présentent l'avantage d'être faites, ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, en couche monocellulaire. Nous pouvons dès lors, avec moins de risques d'erreur que sur culture en goutte pendante, déterminer l'index mitotique pour 1.000 cellules.

TABLEAU V

	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	5 heures
TÉMOINS (% mitoses)					
— Prophase	20	26	27	22,5	19
— Métaphase	46,5	39,5	48	48	58
— Anaphase	12	8,5	9	7,5	7,5
— Télaphase	18,5	26	16	22	15
I.M. ‰	30	28	23	32	31
ACTINOMYCINE (% mitoses)					
— Prophase	16	12,5	13,5	13,5	11
— Métaphase	51,5	62	56	58	66
— Anaphase	15	11	9,5	13,5	11
— Télaphase	17	15,5	21	15	12
I.M. ‰	24,5	22	17,9	18	14,7
Diminution de l'I.M. en ‰	18	21,4	22,2	41,2	52,6

RÉACTION NUCLEAIRE DE FEULGEN
Photos prise



R CULTURES DE 48 HEURES
 raste de phase

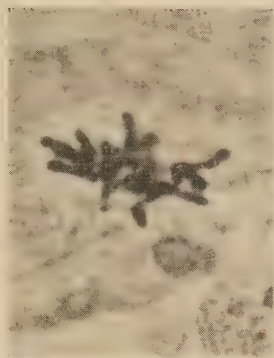
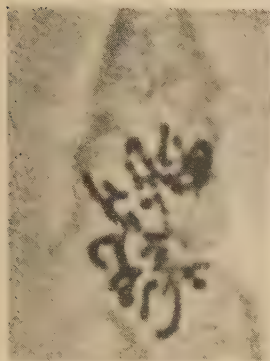


FIGURE 1

Témoins montés dans la
 solution de Hanks pendant
 3 h 30

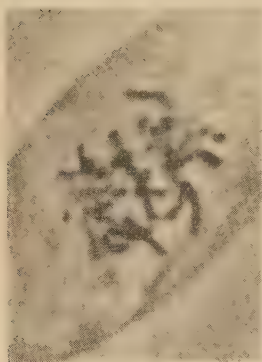


FIGURE 2

Solution d'Actinomycine
 à 10^{-7} pendant 3 h 30



FIGURE 3

Solution d'Actinomycine
 à 10^{-6} pendant 3 h 30

L'actinomycine est introduite à la concentration de 10^{-6} dans le milieu nutritif et laissée au contact des cellules une, deux, trois, quatre et cinq heures. Aux mêmes heures, des témoins sont prélevés, fixés et colorés.

Nous avons observé une chute de l'index mitotique, manifeste dès la première heure et qui s'accroît de façon notable après quatre heures de contact pour dépasser 50 % après cinq heures.

Par contre, nous ne pouvons pas parler de blocage métaphasique.

Nos observations sont résumées dans le *tableau V*.

Les cellules de souche Hela, cultivées en présence d'actinomycine, se sont révélées beaucoup plus sensibles que les fibroblastes d'embryon de poulet. En effet, l'actinomycine à la concentration 10^{-7} , entraîne un arrêt total de la croissance et des altérations cellulaires importantes ne permettant aucune reprise de la croissance après seulement vingt-quatre heures de contact.

III. — ACTION CYTOTOXIQUE

L'actinomycine n'agit pas seulement sur la mitose, elle provoque des altérations des mitochondries et des nucléoles dont nous avons pu suivre le développement au microscope à contraste de phase.

1) ACTION SUR LES MITOCHONDRIES (Cf. *fig. 6 et 7*, p. 34)

Dès la première heure de contact avec la solution d'actinomycine, on peut observer une fragmentation des mitochondries qui ultérieurement vont s'épaissir, s'arrondir et cavuler. Ces modifications sont constantes et d'autant plus marquées que la concentration est plus élevée. Elles sont au moins, jusqu'à un certain stade, compatibles avec un très bon état cellulaire.

2) ACTION SUR LES NUCLEOLÉS

Les modifications morphologiques des nucléoles sont un peu plus précoces. Elles avaient été signalées par Mme SCHAR et nous les avons retrouvées constamment dans nos préparations.

Au bout de quarante-cinq minutes, pour des concentrations d'actinomycine 10^{-6} ajoutées extemporanément à des cultures de quarante-huit heures, on est frappé par l'aspect très sombre, très con-

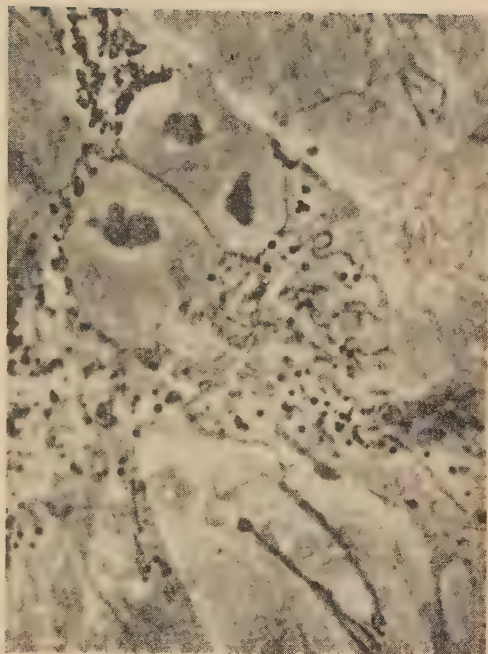
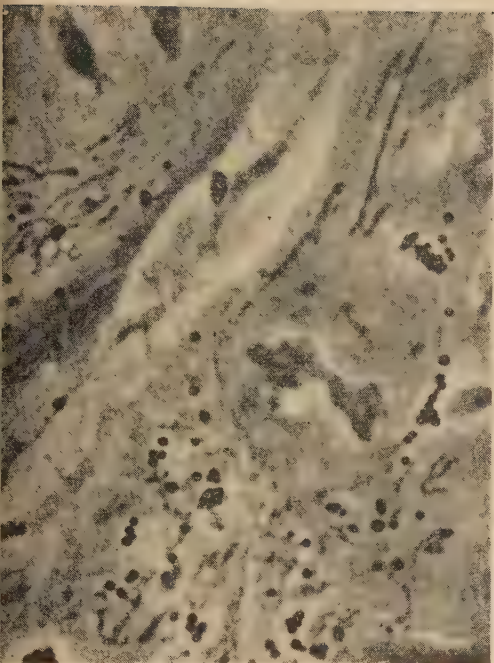


FIGURE 4

Fibroblastes normaux d'embryon de poulet après 48 heures de culture
Remarquez l'aspect des nucléoles et des mitochondries



FIGURE 5

Un aspect extrême de la fragmentation des nucléoles après 6 heures 1/2 de contact
avec une solution d'actinomycine à 10^{-6}



FIGURE 6. — Après 1 heure 1/2 de contact avec la solution d'actinomycine C

Culture de fibroblastes d'embryons de poulet

Remarquez la fragmentation des mitochondries

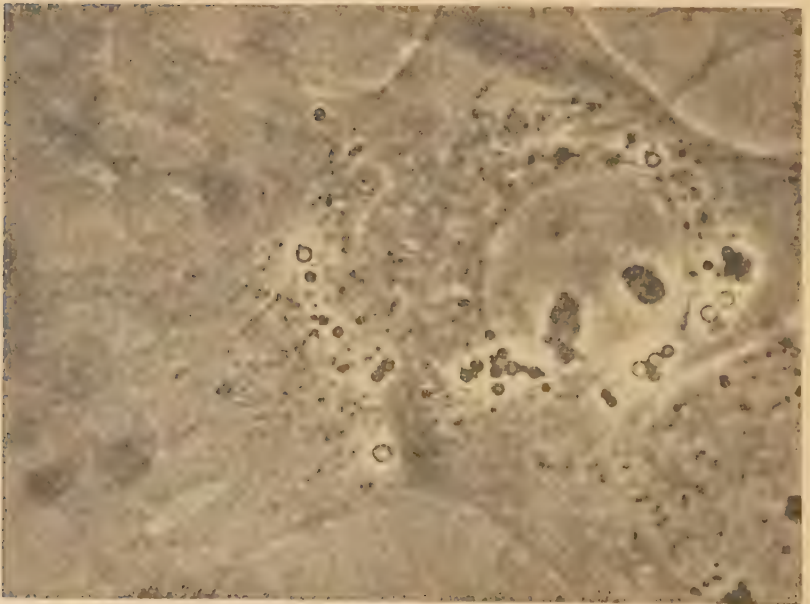


FIGURE 7. — Après 3 heures 1/2 de contact

trasté des nucléoles qui prennent en même temps une forme sphérique ; puis après un contact de deux à trois heures, les nucléoles ont un aspect de petites mûres dont les grains vont se séparer soit en donnant une image en chapelet, soit en se dispersant dans tout le noyau (*fig. 5*, p. 33 ; *fig. 8* et *9*, p. 36).

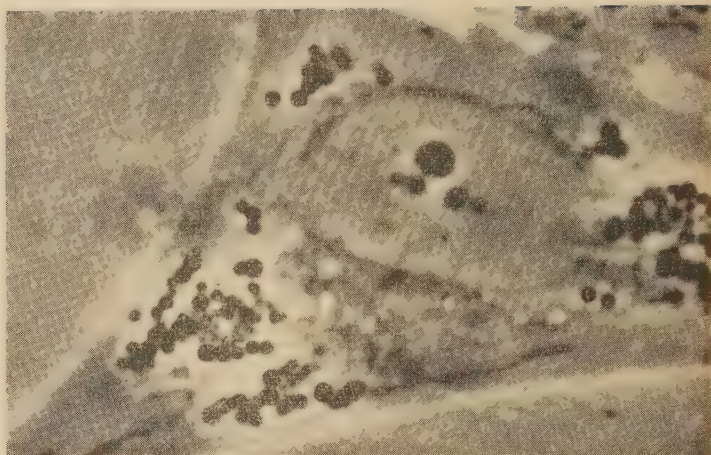
Ces observations rappellent celles faites par M. CHEVREMONT au cours de son : « Etude sur l'action de la ribonucléase en culture de tissus », [63].

Nous avons toujours retrouvé ces modifications des nucléoles lorsque l'actinomycine est introduite directement dans le milieu de culture à des concentrations variant de $1/2 \cdot 10^{-6}$ à $1/4 \cdot 10^{-7}$. Si nous réexplantons dans un milieu normal des fragments d'abord cultivés quarante-huit heures en présence d'actinomycine à une concentration partiellement inhibitrice ($1/4 \cdot 10^{-7}$) mais suffisante pour provoquer des modifications nucléolaires, nous observons une reprise normale de la croissance avec disparition complète des lésions nucléolaires.

L'actinomycine, à la concentration 10^{-6} , entraîne des lésions irréversibles et la mort cellulaire.

FIGURE 8

Après 2 heures 1/2
de contact



FRAGMENTATION DES NUCLEOLES

Culture de 48 heures en présence d'actinomycine C à 10^{-6}

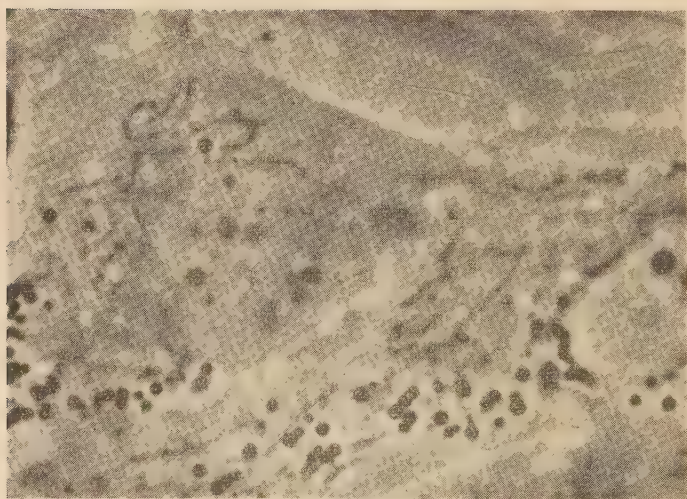


FIGURE 9

Après 7 heures de
contact

ESSAI D'INTERPRÉTATION DE L'ACTION TOXIQUE DE L'ACTINOMYCINE DISCUSSION DES RÉSULTATS

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'action des poisons cellulaires. On peut envisager : soit un blocage de certains systèmes enzymatiques, soit une action compétitive, la substance toxique se substituant ou se combinant à certains métabolites essentiels, rendant par là impossible leur utilisation par la cellule.

En 1939, LEFÈVRE [64] a constaté que la colchicine et le phényl-uréthane étaient susceptibles d'inhiber certaines déshydrogénases.

P. DUSTIN [65] explique le blocage pré-prophasique ou l'empêchement de la polarisation du fuseau dus à différents antimitotiques par l'inhibition d'un enzyme.

MAC FARLANE [66] pense qu'on peut également expliquer ainsi l'action des poisons mitotiques du type colchicine ; il envisage plus particulièrement l'inhibition des enzymes respiratoires.

MONTALENTI et DE NICOLA [67] ont observé que les phosphatases nucléaires et cytoplasmiques ne peuvent plus être mises en évidence après l'action de l'ypérite et du nitrate de mercure, tandis que les phosphatases nucléolaires ne sont que peu ou pas altérées.

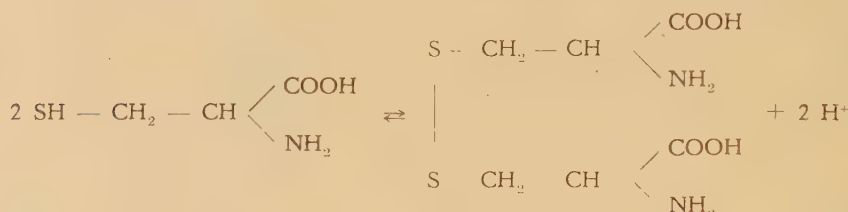
Le béryllium [68] provoque des lésions mitotiques et des anomalies cytoplasmiques caractéristiques en inhibant la phosphatase alcaline nucléaire (M. CHÈVREMONT et collaborateurs).

ACTION ANTIMITOTIQUE

L'analogie d'action de l'actinomycine avec les poisons radiomimétiques [69, 70, 71, 72, 73, 74], en particulier avec les quinones, nous a fait envisager la possibilité d'une oxydation des groupements fonctionnels sulfhydriles dont on connaît l'importance dans la croissance cellulaire, oxydation qui serait responsable du blocage métaphasique.

Nous savons que le groupement chromophore de l'actinomycine est une anthraquinone. L'action antimitotique de la drogue est-elle due à sa fonction quinone ? et, dans ce cas, pouvons-nous l'inhiber par un apport de groupements SH en excès ?

Nous avons pensé que la cystéine pourrait exercer ce rôle inhibiteur. On sait en effet, qu'au cours des phénomènes d'oxydo-réduction, la cystéine intervient comme donateur d'hydrogène :



l'hydrogène libéré pourrait bloquer la fonction quinone de l'actinomycine.

Nous avons donc étudié l'action d'un mélange actinomycine C + cystéine (celle-ci à concentration double) comparativement à l'action de l'actinomycine seule sur culture de quarante-huit heures — contact deux heures et demie.

Les lésions nucléolaires et le blocage métaphasique persistent.

La cystéine employée dans cette expérience étant un chlorhydrate, on peut se demander si la présence de l'ion Cl modifie la solubilité de la cystéine dans le Hanks, ou la mobilité de l'ion hydrogène ; ou bien si la concentration employée n'apporte pas suffisamment de groupements SH pour compenser l'action oxydante de l'actinomycine dont la formule chimique comprend peut-être plusieurs fonctions avides d'hydrogène. D'autre part, notons que les solutions ne sont pas faites à partir d'équivalents moléculaires puisque la formule exacte de l'actinomycine n'est pas encore connue, mais seulement à partir d'équivalents pondéraux (1 γ d'actinomycine par cm³ de solution pour 2 γ de chlorhydrate de cystéine).

En vérifiant nos solutions par la réaction colorée au nitroprussiate de soude en milieu alcalin, nous avons constaté qu'il fallait, non pas une concentration de cystéine double de celle de l'actinomycine, mais bien quadruple pour avoir dans la solution des groupements sulfhydryles en excès. Nous avons donc recommencé l'expérience avec une concentration quadruple, mais les résultats sont demeurés sensiblement les mêmes : les altérations nucléolaires sont tout aussi intenses que dans les cultures mises en présence d'actinomycine seule

et le pourcentage des métaphases est à peine diminué — 70 et 72 % contre 82 %.

Par contre, lorsque nous utilisons le glutathion, plus soluble que la cystéine, et dont la mobilité de l'ion H serait accrue par la présence des radicaux glutamyl et glycyl [75], il suffit de 2 γ pour lever complètement le blocage métaphasique ; nous trouvons en effet 38,5 % de métaphases dans les cultures traitées par le mélange actinomycine C + glutathion, contre 43 % chez les témoins montés dans la solution de Hanks et 82 % dans les cultures traitées par l'actinomycine seule.

Mais le mélange actinomycine + glutathion extemporané n'empêche pas les modifications nucléolaires.

L'action comparative sur les mitoses de l'actinomycine, la cystéine et le glutathion est résumée dans le *tableau VI* et le *graphique 3*.

TABLEAU VI

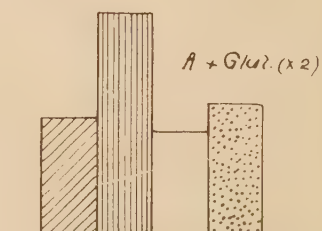
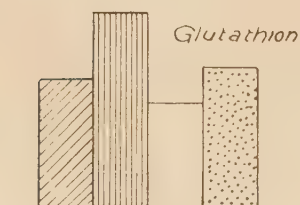
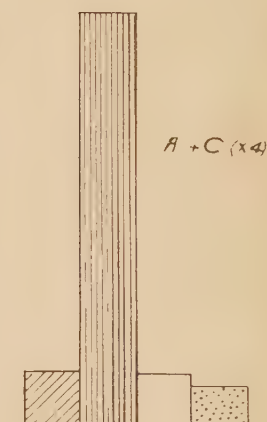
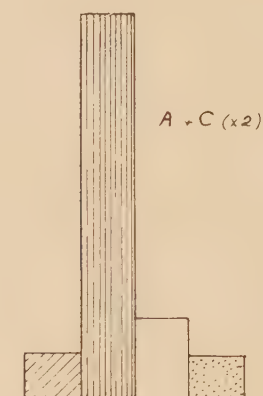
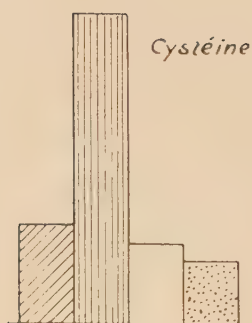
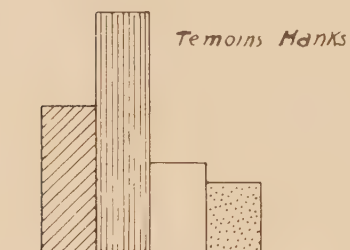
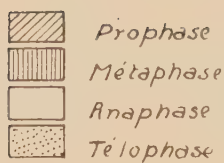
<i>Solutions</i>	<i>Nombre de métaphases pour 100 mitoses</i>
Hanks	43
Actinomycine C 10^{-6}	82
Cystéine 2×10^{-6} et 4×10^{-6}	56
Glutathion 2×10^{-6}	34,5
Actinomycine 10^{-6} + Cystéine 2×10^{-6}	70
Actinomycine 10^{-6} + Cystéine 4×10^{-6}	72
Actinomycine 10^{-6} + Glutathion 2×10^{-6}	38,5

Nous avons également étudié l'incidence du glutathion et de la cystéine sur des fragments d'embryons de poulets cultivés en présence d'actinomycine.

L'actinomycine C, à la concentration $1/2 \cdot 10^{-6}$, inhibe totalement la croissance, alors que le mélange actinomycine 10^{-6} + cystéine 4×10^{-6} et actinomycine 10^{-6} + glutathion 2×10^{-6} , n'entraîne pas de différence avec les témoins.

Après quarante-huit heures de cultures, les mitoses se répartissent ainsi (*tableau VII*) :

GRAPHIQUE 3



TABEAU VII

Conditions de culture	Pour 100 mitoses			
	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
Normale	16	48	20	16
En présence de cystéine 4×10^{-6} ..	15	44	26	15
En présence de glutathion 2×10^{-6} ..	12,5	49	11	27,5
En présence d'un mélange A + C ..	20	56	12	12
En présence d'un mélange A + G ..	15	51	18	14

Les lésions nucléolaires persistent, beaucoup moins intenses que dans le cas de l'actinomycine seule. Elles se traduisent par une densification et un arrondissement des nucléoles avec, dans le cas du mélange actinomycine + cystéine, quelques fragmentations.

La différence que nous observons avec la cystéine en action extemporanée et introduite directement dans le milieu de culture, peut, peut-être s'expliquer par le fait que, dans le premier cas, le mélange agit sur des cultures de quarante-huit heures dont le potentiel de croissance est pratiquement épuisé, alors que dans le second cas l'action de l'extrait embryonnaire riche en facteur de croissance, et particulièrement en groupements SH, s'ajoute à l'activité métabolique des cellules pour exercer une action antitoxique.

Il semble donc que l'actinomycine agisse par deux mécanismes différents :

- l'un s'exerçant sur la mitose, probablement par l'intermédiaire d'une oxydation des groupements SH de la cellule et qu'on peut inhiber par le glutathion ;
- l'autre au niveau des nucléoles.

ACTION SUR LES NUCLÉOLES

L'action sur les nucléoles est particulièrement intéressante ; nous avons vu qu'elle se traduisait au maximum par une dispersion dans tout le noyau de grains arrondis, très fortement contrastés à l'observation au microscope à contraste de phase, pyroninophiles dans les préparations fixées et colorées par le mélange de Unna-Papenheim.

Entre l'aspect normal et l'état complet de dispersion, le nucléole prend un aspect muriforme dans lequel les grains se trouvent encore

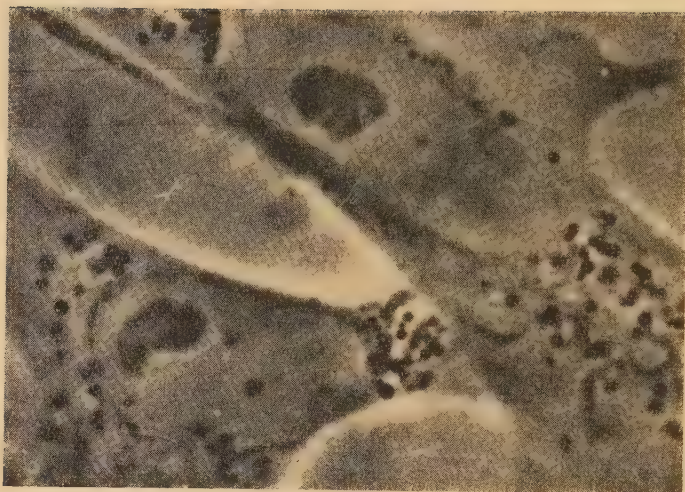


FIGURE 10
Après 1 heure de
contact

FRAGMENTATION DES NUCLEOLES

Culture de 48 heures en présence d'actinomycine C à 10^{-6}

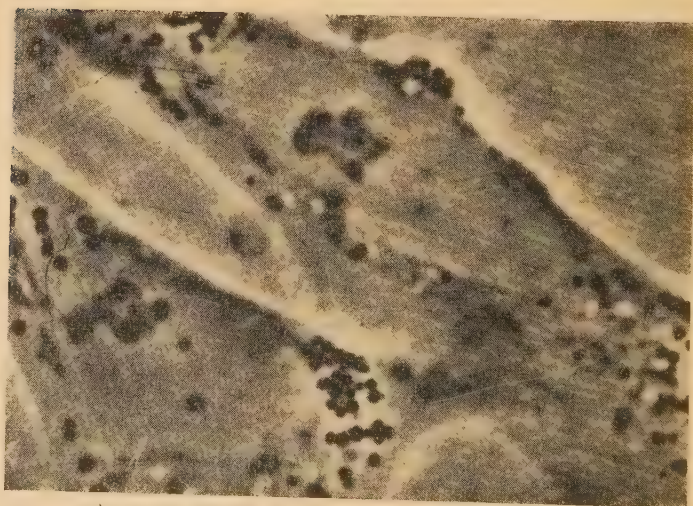


FIGURE 11
Après 2 heures 1/2
de contact. Notez
l'aspect réticulé des
nucléoles

reliés par une zone moins contrastée mais cependant plus que l'ensemble du noyau et qui n'est pas pyroninophile.

Ces aspects peuvent être rapprochés de ceux décrits par HUGHES, en 1952 [76], lorsqu'il fait agir l'adénosine seule ou combinée à l'acide phosphorique.

LETTRE et SIEBS [77], qui ont également étudié l'action de l'adénosine sur les nucléoles, décrivent des aspects assez voisins de ceux que nous avons observés.

CHEVREMONT, CHEVREMONT-COMHAIRE et FIRKET [78] ont montré que la ribonucléase inhibait la croissance des cellules animales normales et provoquaient des altérations nucléolaires morphologiquement identiques à celles que provoquent l'actinomycine C. Fait particulier, ces lésions disparaissent par addition d'acide ribonucléique.

Pouvons-nous invoquer dans le cas de l'actinomycine C, un phénomène enzymatique au niveau des acides ribonucléiques cellulaires ? phénomène qu'on pourrait, comme dans le cas de la ribonucléase, inhiber par un excès d'acide ribonucléique.

Des cultures de quarante-huit heures, sur lesquelles ont fait agir extemporanément un mélange d'actinomycine 10^{-6} et d'acide ribonucléique 10^{-4} , présentent les mêmes lésions que sous l'action de l'actinomycine seule.

Ces lésions persistent également lorsque, suivant le protocole expérimental de CHEVREMONT, nous réexplantons dans un milieu composé de jus embryonnaire, plasma, Hanks et acide ribonucléique 10^{-4} , des fragments qui présentaient des altérations nucléolaires après avoir été cultivées quarante-huit heures en présence d'actinomycine 10^{-1} .

L'acide ribonucléique n'est donc pas capable d'inhiber ni de « réparer » les modifications nucléolaires dues à l'action de l'actinomycine C.

S'il est possible d'envisager l'hypothèse d'une action de la ribonucléase par libération d'adénosine qui pourrait exercer ensuite son action toxique sur les nucléoles, rien ne nous permet de formuler une hypothèse semblable dans le cas de l'actinomycine, et nous ne pouvons que constater les modifications morphologiques qu'elle provoque.

CONCLUSION

I. — Nos observations, en culture de tissus, rejoignent les observations faites *in vivo* par HACKMAN sur l'action antimittotique de l'actinomycine.

II. — Nous avons constaté également, pour des doses subléthales, une chute de l'index mitotique avec augmentation du nombre des métaphases et une réversibilité des lésions, responsable sans doute des échecs de cette drogue en thérapeutique.

III. — Sur fibroblastes d'embryons de poulet et sur cellules de carcinome humain, nous avons montré que l'actinomycine exerçait en plus de son action antimittotique, une action toxique au niveau du chondriome et des nucléoles.

Le mécanisme de ces actions toxiques a pu être différencié grâce au glutathion.

IV. — En ce qui concerne l'action antimittotique, il est fort probable que l'actinomycine intervient dans les phénomènes d'oxydo-réduction par la fonction quinone de son groupement chromophore qui agirait au niveau des groupements SH fonctionnels de la cellule. On peut en effet inhiber l'action antimittotique de l'actinomycine par le glutathion.

V. — En ce qui concerne les nucléoles, il ne nous a pas été possible de modifier la toxicité et cet antibiotique par le même moyen, et nous n'avons aucune hypothèse à proposer quant au mécanisme possible de cette action toxique.

Nous ne pouvons que constater sa réversibilité après réexplantation en milieu normal, ce qui laisse supposer que l'extrait embryonnaire contient le ou les facteurs susceptibles de « réparer » les lésions provoquées par l'actinomycine.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
VERNE

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

1. EICHORN (P.A.), HUFFMAN (K.V.), OLESON (J.J.), HALLIDAY (S.L.) and WILLIAMS (J.H.). — A comparison of *in vivo* and *in vitro* tests for anti-neoplastic activity of eight compounds. (*Ann. N.Y. Acad. of Sc.*, 1954, 58, 1172.)
2. POMERAT (C.M.), LEAKE (C.D.). — Short term cultures for drug assays: General considerations. (*Ann. N.Y. Acad. of Sc.*, 1954, 58, 1110.)
3. VERNE (J.). — Cellular sensitivity to drug action in short term tissue cultures: *in vitro* correlations with sensitivity *in vivo*. (*Ann. N.Y. Acad. of Sc.*, 1954, 58, 1113.)
4. BIESELE (J.J.). — Assay of carcinolytic and carcinostatic agents. (*Ann. N.Y. Acad. of Sc.*, 1954, 58, 1129.)
5. EAGLE (H.), FOLEY (G.E.). — Action cytotoxique d'agents carcinolytiques dans les cultures tissulaires. (*Am. J. Med.*, 1956, 21, 739.)
6. VERNE (J.). — Action toxique du sulfate d'atropine sur les tissus cultivés *in vitro*. (*C.R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 468.)
7. WAKSMANN (S.A.), WOODRUFF (H.B.). — Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by a soil actinomycetes. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1940, 45, 609.)
8. WAKSMAN (S.A.). — On the classification of actinomycetes. (*J. Bacteriol.*, 1940, 39, 549.)
9. WAKSMAN (S.A.), ROBINSON (H.), METZGER (H.), WOODRUFF (H.B.). — Toxicity of actinomycin. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, 47, 261.)
10. WAKSMAN (S.A.), HENRICI (A.T.). — The nomenclature and classification of the actinomycetes. (*Journal Bact.*, 1943, 46, 337.)
11. WAKSMAN (S.A.), LECHEVALLIER (H.A.). — Actinomycetes and their antibiotics. (Baltimore, 1953.)
12. WAKSMAN (S.A.). — Actinomycin. I, Historical. Nature and cytostatic action. (*Antibiot. Chem.*, 1954, 4, 502.)
13. WAKSMAN (S.A.), GREGORY (F.J.). — Actinomycin. II, Classification of organisms producing different forms of actinomycetes. (*Antibiot. Chem.*, 1954, 4, 1050.)

14. BROCKMANN (H.), GRÜBHÖFFER (N.). — Actinomycin C. (*Naturwiss.*, 1949, 36, 367.)
15. BROCKMANN (H.), GRÜBHÖFFER (N.). — Zur Kenntnis des Actinomycins C. (*Naturwiss.*, 1950, 37, 494.)
16. BROCKMANN (H.). — Über das Actinomycin C. (*Chem. Ber.*, 1950, 84, 260.)
17. DALGLIESH (C.E.), TODD (A.R.). — Actinomycin. (*Nature*, 1949, 164, 830.)
18. WAKSMANN (S.A.), GEIGER (W.), REYNOLDS (D.). — Strain specificity and production of antibiotic substance. VII, Product of actinomycin by different actinomycetes. (*Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 1946, 32, 117.)
19. WELSCH (M.). — Streptomyces producteurs d'actinomycine ou d'une substance voisine mais cependant différent de *Streptomyces antibioticus*. (*C.R. Soc. Biol.*, 1946, 25, 557.)
20. TRUSSEL (P.), RICHARDSON (E.). — Actinomycin from a new « Streptomyces ». (*Canad. J. Res.*, 1948, 26, 27.)
21. UMEZAWA (H.), HAYANO (S.), TAKENCHI (T.), MIZUHARA (Y.). — Isolation of actinomycin from a strain of streptomyces. (*Japan Med. Journ.*, 1948, I, 100.)
22. KOCHOLATY (W.R.), KELNER (A.). — Actinomycin A produced by a soil actinomycetes different from *Actinomyces antibioticus*. (*Arch. Bioch.*, 1948, 17, 191.)
23. MONESI (V.), VERONESI (U.). — Ricerche sull'attività antimittotica di una nuova actinomica. (*Biol. Lat.*, 1955, 8, 290.)
24. MANAKER (R.A.), GREGORY (F.J.), VINING (L.C.), WAKSMAN (S.A.). — The production and properties of a new actinomycin. (*Antibiotic Annual.*, 1954-1955, p. 851.)
25. BROCKMANN (H.). — Symposium sur l'actinomycine. (*Presse Médicale*, 1957, 65, 52.)
26. SARLET (H.). — Note sur l'actinomycine produite par S. 67. (*Enzym.*, 1950, 14, 49.)
27. SARLET (H.). — Acides aminés des actinomycines produites par streptomyces S. 67. (*Bioch. Biophys. Acta*, 1953, 12, 143.)
28. BROCKMANN (H.), BOHNSACH (G.), GROENE (H.), LINGE (H.). — Papier chromatographische Trennung des actinomycin. Der Aminosäuregehalt des Actinomycin. Zur Kenntnis des Actinomycin X. (*Naturwiss.*, 1953, 40, 222.)
29. BROCKMANN (H.), BUDDE (G.). — Zur Kenntnis des despeptido-actinomycin. (*Naturwiss.*, 1953, 40, 259.)
30. BROCKMANN (H.), GROENE (H.). — Reine Actinomycin. (*Naturwiss.*, 1954, 41, 65.)
31. BROCKMANN (H.), VOHNWINKEL (R.). — Zur Kenntnis der Farbstoffkomponente der Actinomycin. (*Naturwiss.*, 1954, 41, 257.)

32. BROCKMANN (H.), FRANCK (B.). — Abbau der actinomycin zu desamino-actinomycinen. (*Naturwiss.*, 1954, 41, 451.)
33. BROCKMANN (H.), GROENE (H.). — Darstellung und Charakterisierung reiner actinomycin. XII, Mitteil über actinomycin-antibiotica aus actinomyceten. (*Chem. Ber.*, 1954, 87, 1031.)
34. BROCKMANN (H.), FRANCK (B.). — Abbau der actinomycin zu desamino-actinomycinen über actinomycin. Antibiotica aus actinomyceten. (*Chem. Ber.*, 1954, 87, 1767.)
35. BROCKMANN (H.). — Chemie und Biologie der Actinomycin. (*Ang. Chem.*, 1954, 1, 1.)
36. BROCKMANN (H.), BONNE (A.), FRIEDRICH (H.). — Zur Entstehungsgeschichte des H.B.F. 386 Actinomycin C Bayer. (*Dtsch. Med. Wschr.*, 1954, 11, 437.)
37. VINING (L.C.), WAKSMANN (S.A.). — Paper chromatographie identification of actinomycin. (*Science*, 1954, 120, 389.)
38. GIOSEFFI (G.). — L'actinomicine C. (*Boll. Chimicofarma*, 1954, 93, 49.)
39. SCHWARTZ (K.), ROLPH (G.S.). — Actinomycin C. (*The Pharm. J.*, 1956, 176, 215.)
40. SCHMIDT-KASTNER (G.). — Über neue biosynthetische Actinomycin. (*Med. und Chemic.*, 1956, p. 463.)
41. HACKMANN (Ch.). — Experimentelle untersuchungen über die Wirkung von actinomycin C (H.B.F. 386) bei bösartigen geschwulsten. (*Zeitsch. für Krebsf.*, 1952, 58, 607.)
42. DES CHAUMES (J.). — Antibioticos e cancro. (*J. Med. Porto*, 1953, 22, 943.)
43. HACKMANN (Ch.). — H.B.F. 386. Ein cytostatisch Wirksamer-naturstoff. (*Strahlentherapie*, 1953, 90, 296.)
44. PFENNIG (N.). — Untersuchungen an Actinomycin-bildenden Strahlenpilzstämmen und deren Actinomycinen. (*Arch. Mikrob.*, 1953, 18, 327.)
45. HACKMANN (Ch.). — Actinomycin C. Biologische Eigenschaften und therapeutische verwendung. (*Clinica Therapeutica*, 1954, 7, 406.)
46. HACKMANN (Ch.). — Untersuchungen über den Einflutz des Sanamycin (Actinomycin C) auf tierische organe: Milz, Thymus Lymphknoten, Webeniemen und Keidrüsen. (*Zeitschr. für Krebsforschung*, 1954, 60, 250.)
47. HUGUENIN (R.), TRIHAUT (R.), BOURDIN (J.S.). — Experimentation de l'actinomyicine. (*Presse Méd.*, 1954, 62, 740.)
48. HACKMANN (Ch.). — Fortschritte auf dem gebiete der experimentellen Krebsforschung. (*Deutsch. Tierarzt. Woch.*, 1955, 7, 73.)
49. FIELD (J.B.). — Experimental evaluation of the anticarcinogenic activity of a new antibiotic, Actinomycin C. (*Antibiotics Annal*, 1954-1955, p. 842.)
50. HACKMANN (Ch.). — Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen (Antibiotika) als antineoplastische Wirkstoffe. (*Dtsch. Med. Wschr.*, 1955, 21, 812.)

51. DE CORT (J.). — Action antitumorale de l'actinomycine chez la souris. (*Bull. Ass. Franç. pour l'Etude du Cancer*, 1956, 43, 112.)
52. WAKSMAN (S.A.), PUGH (L.H.), KATZ (E.). — Antibiotic and cytostatic properties of the actinomycins. (*Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 1956, 2, 155.)
53. REISSIG (M.), HOWES (D.W.), MELNICK (J.L.). — Sequence of morphological changes in epithelial cell cultures infected with poliovirus. (*J. Exp. Med.*, 1956, 104, 289.)
54. LANGERON (M.). — Précis de microscopie, p. 426. (Paris, Masson et Cie édit., 1949.)
55. LANGERON (M.). — Précis de microscopie, p. 435.
56. LISON (L.). — Histochimie et cytochimie animales, p. 283. (Paris, Gauthier-Villars édit., 1953.)
57. LISON (L.). — Histochimie et cytochimie animales, p. 264.
58. WILSON (J.L.). — Tolerance and acquired tolerance of the mesenchyme cells in tissue culture for copper sulfate and sodium arsenite. (*Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1922, 33, 375.)
59. VERNE (J.). — Sur l'accoutumance aux toxiques des cellules cultivées *in vitro*. (*Acta Anat.*, 1947, 4, 282.)
60. VERNE (J.). — Sensibilité et accoutumance aux toxiques des cellules cultivées *in vitro*. (*J. Physiol. et Path. Gén.*, 1948, 40, 1.)
61. MOELLENDROFF (W. von). — Zur Kenntniss der Mitose. II, Die Phasenteilung in der Fibrozytenkultur und deren Abwandlung durch substanzzusätze. (*Zeitschr. f. Zellforsch.*, 1938, 27, 30.)
62. DEYSSON (G.), TRUIHAUT (R.). — Action radiomimétique des actinomycines C et D sur la division des cellules végétales. (*C.R. Ac. Sc.*, 1954, 239, 83.)
63. CHEVREMONT (M.), CHEVREMONT-COMHAIRE (S.), FIRKET (H.). — Etude de l'action de la ribonucléase sur des cellules vivantes cultivées *in vitro* et en particulier de ses effets sur la mitose. (*Arch. Biol.*, 1956, 67, 635.)
64. LEFÈVRE (J.). — Similitude des actions cytologiques exercées par le phényluréthane et la colchicine sur des plantules végétales. (*C.R. Ac. Sc.*, 1939, 208, 301.)
65. DUSTIN (P.). — Some new aspects of mitotic poisoning. (*Nature*, 1947, 159, 794.)
66. MAC FARLANE (E.W.E.), SCHMOCK (N.G.). — The colchicine and colchicine-like reaction as a possible response to enzymic poisoning. (*Science*, 1948, 108, 712.)
67. MONTALENTI (G.) et DE NICOLA (M.). — Comportamento dello fosfatasi alcalina all'azione di alcuni celeni carioclastici. (*Experientia*, 1948, 4, 314.)
68. CHEVREMONT (M.), FIRKET (H.). — Action du béryllium en culture de tissus II, Etude histochimique. Mécanisme d'action du Be et rôle de la phosphatase alcaline nucléaire dans la mitose. (*Arc. Biol.*, 1952, 63, 515.)

69. DUSTIN (P.), GOMPEL (C.). — Action du peroxyde d'hydrogène sur les mitoses intestinales de la souris. (*C.R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 874.)
 70. FRIEDMANN (E.), MARRIAN (D.), SIMON-REUSS (I.). — Sulphydryl addition compounds of some quinones and related substances in their action on the growth of normal cells. (*Brit. J. Pharmacol.*, 1948, 3, 335.)
 71. SÉNÉGAS (A.), POURQUIER (H.). — Aperçu sur l'action des rayons X de quelques poisons mitotiques sur la division cellulaire. (*Montpellier Méd.*, 1941-1942, 6, 614.)
 72. DUSTIN (P. Jr). — Note sur le mécanisme d'action des poisons radiomimétiques. (*C.R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 1433.)
 73. PARMENTIER (R.). — Note sur l'action antimitotique de quelques phénols et amines aromatiques chez la souris. (*C.R. Soc. Biol.*, 1948, 143, 585.)
 74. RICHARD (M.), PÉGUIRON (L.), NEUKOMM (S.). — Recherches sur l'endommagement des cultures de fibroblastes par les quinones. (*Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1954, 100, 49.)
 75. POLONOWSKI (M.). — Biochimie médicale. (Paris, Masson édit., 1949.)
 76. HUGHES (A.). — The effect of purines and related substances upon cells in chick tissue culture. (*Exp. Cell. Res.*, 1952, 3, 108.)
 77. LETTRÉ (R.), SIEBS (W.). — Beobachtungen zur struktur des nucleolus in normalen Zellen sowie in Tumorzellen. (*Zeitsch. Krebsforsch.*, 1955, 60, 564.)
 78. CHEVREMONT (M.), CHEVREMONT-COMHAIRE (S.), FIRKET (H.). — Etude de l'action de la ribonucléase sur les cellules cultivées *in vitro* et en particulier de ses effets sur la mitose. (*Arch. Biol.*, 1956, 67, 635.)
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
HISTORIQUE	14
— Propriétés chimiques	14
— Activités biologiques	15
— Plan de nos recherches	16
TECHNIQUES	17
— Culture	17
— Fixations et colorations des préparations	18
— Evaluation des résultats	23
RÉSULTATS	24
— Action sur la croissance	24
— Action antimitotique	26
— Action cytotoxique	32
ESSAI D'INTERPRÉTATION DE L'ACTION TOXIQUE DE L'ACTINOMYCINE — DISCUSSION DES RÉSULTATS	37
— Action antimitotique	37
— Action sur les nucléoles	41
CONCLUSION	45
BIBLIOGRAPHIE	47

